

氏 名	朴 雅 美		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 番 号	第 4356 号		
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者		
学 位 論 文 名	Mechanism of Strong Resistance of <i>Helicobacter pylori</i> to Nitric Oxide ( <i>Helicobacter pylori</i> の一酸化窒素抵抗性機構の解析)		
論文審査委員	主 査 教 授 井 上 正 康	副主査	荒 川 哲 男
	副主査 教 授 平 川 弘 聖		

#### 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】胃炎の起炎菌である *H. pylori* (HP) は胃粘膜に生息する微好気性螺旋状桿菌である。これまでの研究で一酸化窒素 (NO) は低濃度で好気性細菌の呼吸を抑制し、その作用は低酸素環境下で増強されることを明らかにしてきた。NO 合成酵素や食物中の硝酸塩に由来する NO が高濃度に存在する胃液の酸素濃度は低く、NO と胃酸が強力な感染防御系を構築している。高いウレアーゼ活性を有する HP は、尿素から産生したアンモニアにより菌体周辺の胃酸を中和してその殺菌作用を回避している。しかし、NO の殺菌作用に対する反応は不明な点が多い。今回、HP の胃内生存機構を解明する目的で NO 代謝特性を解析した。

【方法】大腸菌とHP、界面活性剤処理HP、および分離HP膜画分にNOを作用させ、その際の酸素消費速度と溶液中のNO濃度を経時的に測定した。また、HPおよび界面活性剤処理HPに各濃度のNO及びKCNを作用させ各々の阻害作用及び50%阻害濃度を比較解析した。

【結果】大腸菌にNOを作用させると呼吸は可逆的に阻害され、NO濃度は急速に減少した。NOが完全に消失すると呼吸抑制も解除された。一方、HPではNOによる呼吸抑制は非常に弱く、NO濃度低下速度は緩衝液中とほぼ同程度であった。Triton X-100処理HPとHP膜画分ではその酸素消費がNOにより可逆的に阻害されてNO濃度も速やかに減少し、NO消失により酸素消費阻害も解除された。また、NOとKCNを各々HP、界面活性剤処理HPに作用させたところ、その50%阻害濃度はHPでは界面活性剤処理HPの約4倍であった。

【結論】NOはミトコンドリアや大腸菌の電子伝達系終末オキシダーゼを強く阻害するが、NOが分解されると呼吸抑制作用も解除される。HP生菌のシトクロームcオキシダーゼはNO親和性が極めて低いいため、その呼吸抑制作用も弱い。しかし、界面活性剤で膜を部分的に破壊するとNO親和性が増加して呼吸が強く抑制されると同時に、NO分解反応も加速されることが示唆された。また、本オキシダーゼの膜内局在特性により、HPIはNO濃度の高い胃液中でも生存可能であることが示唆される。

#### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

胃炎の起炎菌である *H. pylori* は胃粘膜に生息する微好気性菌である。本論文の著者は、一酸化窒素 (NO) が好気性細菌の呼吸を抑制すること、及びその作用が低酸素下で増強することを報告し、NO 合成酵素や食物中の硝酸塩に由来する NO が高濃度に存在する胃液の酸素濃度は低く、NO と胃酸が強力な感染防御系を構築していることを提唱してきた。*H. pylori* がウレアーゼによりアンモニアを産生して菌体周辺の胃酸毒性を回避していることは熟知されているが、NO の抗菌作用に対する反応は不明である。本研究では *H. pylori* の NO 代謝特性を解析し、その胃内生存戦略における意義を考察している。

本研究では、大腸菌と *H. pylori* の生菌、部分膜傷害 *H. pylori*、および分離 *H. pylori* 膜画分に NO を作用さ

せ、酸素消費速度と溶液中の NO 濃度を経時的に測定した。また、*H. pylori* および膜傷害 *H. pylori* に種々の濃度の NO 及び KCN を作用させ、両者の阻害作用及び 50%阻害濃度を比較解析した。

大腸菌に NO を作用させると、呼吸が可逆的に阻害されると同時に、NO の溶液中濃度も急速に減少した。NO の完全消失に伴い呼吸抑制作用も消失した。一方、*H. pylori* に対する NO の呼吸抑制作用は非常に弱く、NO の分解速度も緩衝液中とほぼ同程度であった。さらに、膜傷害 *H. pylori* と *H. pylori* 膜画分は NO に対して大腸菌と類似の反応性を示した。*H. pylori* の呼吸に対する NO と KCN の 50%阻害濃度は膜傷害 *H. pylori* に対するより約 3 倍高かった。

以上の結果から、*H. pylori* 生菌に対する NO の呼吸抑制作用が弱い理由は、cytochrome c oxidase の NO 親和性が極めて低い事に起因することが判明した。この際、細胞膜を部分的に破壊すると NO 親和性が増加し、呼吸が強く抑制されると同時に NO 分解反応も加速された。従って、細胞膜内での本酵素の局在特性により、*H. pylori* が高 NO 濃度の胃液中でも生存可能であることが示唆された。

本研究は、*H. pylori* の NO 耐性機構を分子レベルで解析し、その胃内での生存戦略を明らかにしたものであり、細菌とホストの共生機構に新たな知見を提供したものと評価される。よって、著者は博士（医学）の学位を授与されるに値するものと判定された。